



①9 **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Off nl gungsschrift**
⑩ **DE 199 54 933 A 1**

⑤1 Int. Cl.⁷:
G 02 B 21/32

②1 Aktenzeichen: 199 54 933.8
②2 Anmeldetag: 10. 11. 1999
④3 Offenlegungstag: 17. 5. 2001

DE 199 54 933 A 1

⑦1 **Anmelder:**

Carl Zeiss Jena GmbH, 07745 Jena, DE; Institut für
Molekulare Biotechnologie e.V., 07745 Jena, DE

⑦2 **Erfinder:**

Wendenburg, Ronald, Dr., 07745 Jena, DE;
Hoffmann, Anja, Dipl.-Phys., 07745 Jena, DE;
Greulich, Karl Otto, Prof., 07745 Jena, DE;
Monajembashi, Shamci, Dr., 69121 Heidelberg, DE;
Uhl, Volker, Dr., 07749 Jena, DE

⑤6 **Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
zu ziehende Druckschriften:**

DE 196 16 216 A1
DE 42 31 004 A1
EP 06 79 325 B1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

- ⑤4 **Anordnung zur Einkopplung einer optischen Pinzette und/oder eines Bearbeitungsstrahles in ein Mikroskop**
- ⑤7 **Anordnung zur Einkopplung mindestens eines Strahles einer optischen Pinzette zum Einfangen von Teilchen und/oder eines Bearbeitungsstrahles in einen mikroskopischen Strahlengang, vorzugsweise in einem Laser-Scanning-Mikroskop, wobei Mittel zur frei einstellbaren Veränderung der Lage des Strahlfokus der optischen Pinzette und/oder des Bearbeitungsstrahles bezüglich der Veränderung der Fokusposition des Mikroskops vorgesehen sind.**

DE 199 54 933 A 1

Beschreibung

Die Erfindung erlaubt die räumliche Fixierung von mikroskopischen Objekten im Laser Scanning Mikroskop, auch während Verschiebung der Objektebene, zum Beispiel bei der Bildaufnahme. Somit können auch sich bewegende Objekte scharf abgebildet werden.

Hintergrund der Erfindung

Für eine Reihe von biologischen Arbeitstechniken hat sich die optische Pinzette als interessantes Arbeitswerkzeug erwiesen. Die Kombination von Laser Scanning Mikroskopen mit Lasermikrotechniken läßt eine Erweiterung der experimentellen Möglichkeiten erwarten.

LSM-Aufnahmen sich bewegender Objekte, vor allem im Inneren ungeöffneter Zellen, ergeben oft nicht zufriedenstellende Bilder, da sich viele subzelluläre Strukturen während der Scanzeit bewegen. Die optische Pinzette läßt sich hier ideal zur schonenden (Vital-)Fixierung einsetzen. Weiterhin ist mit der optischen Pinzette eine räumlich definierte Verschiebung von fixierten Objekten möglich. Anwendungsbeispiele für den Einsatz einer kompensierten optischen Pinzette im Laser Scanning Mikroskop sind die Untersuchung von Organellen, zum Beispiel Chloroplasten, oder das Festhalten von durch Motorproteine bewegten Objekten. Im letzten Fall sind unter geeigneten Bedingungen sogar Kraftmessungen möglich. Grundsätzlich können bewegliche Objekte, beispielsweise Partikel in Suspension oder bestimmte Organellen, ohne Fixierung durch eine kompensierte optische Pinzette, nicht scharf abgebildet werden.

Eine durch das Objektiv eingekoppelte optische Pinzette hat ihren Fokus in der Objektebene. Wird durch den dreidimensionalen Bildaufnahmeprozess ("Scannen") die Objektebene parallel verschoben, so verschiebt sich der Fokus der optischen Pinzette mit. Dies führt dazu, daß Objekte, die durch die optische Pinzette gehalten werden, ebenfalls verschoben werden. Dies ist jedoch während der Bildaufnahme unerwünscht. Deshalb muß die Verschiebung der Objektebene durch eine geeignete Einrichtung im Strahlengang der optischen Pinzette kompensiert werden.

Die Erfindung ist immer dann bei Laser Scanning Mikroskopen verschiedener Hersteller notwendig, wenn die optische Pinzette durch das Objektiv eingekoppelt wird und die dritte Dimension bei der Bildaufnahme durch Verschieben des Objektivs oder des Objektischs oder einer anderen Methode, die den Fokus der optischen Pinzette relativ zur Probe verschiebt, erschlossen wird.

Die Einkopplung der optischen Pinzette in ein inverses Mikroskop über ein zweites hochaperturiges Objektiv, das die optische Pinzette von der anderen Seite der Probe eingekoppelt (K. Visscher, G. J. Brakenhoff: Single Beam Optical Trapping Integrated in a Confocal Microscope for Biological Applications. Cytometry 12: 486-491 (1991)), macht eine kompensierte Bewegung der optischen Pinzette zwar überflüssig, dafür muß sich die Probe aber zwischen zwei Deckgläsern befinden und darf eine gewisse Dicke nicht überschreiten. Weiterhin schränkt diese Art der Einkopplung konventionelle mikroskopische Anwendungen ein, da das Objektiv für die optische Pinzette an der Stelle platziert ist, an der sich im inversen Mikroskop der Durchlichtstrahlengang befindet. Darüber hinaus ist die Probe von oben nicht mehr uneingeschränkt frei zugänglich, was zum Beispiel Anwendungen mit Mikroinjektions- oder Temperiereinrichtungen sehr erschwert, wenn nicht sogar unmöglich macht. Letzteres gilt auch für Aufbauten, bei denen das optische Fixieren von Partikeln durch mit Mikrolinsen versehenen Glasfasern erfolgt, die direkt auf die Probe geführt

werden. Hinzu kommen Probleme mit der Sterilität der Probe, da die Glasfasern in dickere Flüssigkeitsschichten eintauchen müssen, wenn Partikel an der Unterseite der Flüssigkeit fixiert werden sollen.

Beschreibung

Abb. 1 zeigt eine schematische Darstellung der Wirkung der Erfindung,

Abb. 2 die Anwendung in einem Mikroskop wie einem Laser-Scanning-Mikroskop.

Im für die Erfindung relevanten Aufbau wird die optische Pinzette durch das Mikroskopobjektiv in die Objektebene geführt. Sie ist so justiert, daß sich in der Objektebene befindliche mikroskopische Partikel gehalten werden, das heißt, der Fokus der optischen Pinzette liegt in der Objektebene. Bei der dreidimensionalen Bildaufnahme durch ein Laser Scanning Mikroskop muß die Objektebene jedoch parallel verschoben werden, um die aus der Objektebene heraus ragende dritte Dimension zu erschließen. Dadurch verschiebt sich auch der Fokus der optischen Pinzette, was zu einer unerwünschten Verschiebung der fixierten Partikel führt. Ohne Kompensation dieser Verschiebung können dreidimensionale Objekte, die durch die optische Pinzette gehalten werden, nicht dreidimensional aufgelöst aufgenommen werden. Eine Kompensation der Verschiebung der Objektebene, im Folgenden z-Kompensation genannt, besteht aus variablen optischen Elementen, die in der Strahlengang der optischen Pinzette eingefügt werden und die die Bewegung der Objektebene kompensieren. Die z-Kompensation bewirkt eine zur Bewegung der Objektebene simultan ablaufende kompensierende Bewegung der optischen Pinzette, so daß die Position des fixierten Objekts in der Probe erhalten bleibt.

Realisiert wird die Kompensation über ein elektromechanisch verschiebbares optisches Element im Einkoppelsystem der optischen Pinzette. Die exakte Position der Objektebene wird der Steuerelektronik des Laser Scanning Mikroskops während des Bildaufnahmeprozesses entnommen. Entsprechend wird das verschiebbare optische Element im Einkoppelsystem der optischen Pinzette rechnergesteuert verfahren, so daß die Position des fixierten Objekts relativ zur Probe erhalten bleibt. Es ist prinzipiell nicht notwendig, die Position der Objektebene der Steuerelektronik des Laser Scanning Mikroskops zu entnehmen, da die Position der relevanten optischen Elemente auch elektromechanisch oder optisch detektiert werden kann. Dies ist allerdings mit einem größeren Aufwand verbunden.

Wenn der Strahlengang für die optische Pinzette vom Laser zum Mikroskop über Lichtleiter erfolgt, kann die z-Kompensation mit der mikroskopseitigen Halterung des Lichtleiters kombiniert werden. Es entsteht dann eine kompakte Einheit mit einem Minimum an optischen Elementen.

Es besteht auch die Möglichkeit, die z-Kompensation manuell vorzunehmen. Dazu wird das zu untersuchende Objekt in verschiedenen x-y-Schnitten abgetastet. Zwischen den Schnitten wird die Objektebene durch das Laser Scanning Mikroskop verschoben. Vor der Aufnahme des nächsten Schnitts wird die Position des Fokus der optischen Pinzette durch manuelles Verschieben des im Strahlengang der optischen Pinzette befindlichen zusätzlichen optischen Elements wieder an den Ausgangspunkt gebracht. Dieser Vorgang wird für jeden x-y-Schnitt wiederholt. Durch die oben beschriebene rechnergesteuerte elektromechanische Verschiebung des Kompensationselements wird jedoch während der dreidimensionalen Bildaufnahme Zeit gespart, was bei kurzlebigen Präparaten von entscheidender Bedeutung sein kann. Es soll jedoch die z-Kompensation an sich patent-

tiert werden, unabhängig von ihrer technischen Ausführung.

Sollen mehrere in Flüssigkeit bewegliche Objekte untersucht werden, müssen diese alle mit einer optischen Pinzette fixiert werden. Die hier beschriebene z-Kompensation erlaubt auch das Einkoppeln einer sogenannten "Multitrap", einer optischen Pinzette, bei der ein oder mehrere Laserstrahlen zur Fixierung auf mehrere Objekte gelenkt werden. Dies kann auch dadurch geschehen, daß mit Hilfe eines Scannerspiegels ein Strahl abwechselnd in hoher Frequenz auf mehrere Objekte so gelenkt wird, daß diese fixiert bleiben, auch wenn der Laserstrahl nicht permanent das entsprechende Objekt bestrahlt.

Auf gleiche Weise wie die optische Pinzette kann auch ein Lasermikrostrahl kompensiert eingekoppelt werden (Ein Lasermikrostrahl ist ein kurz gepulster Laserstrahl, der in ein Mikroskop eingekoppelt wird, um Mikromaterialbearbeitung durchzuführen). Somit kann für die Einkopplung des Lasermikrostrahls die gleiche Optik wie für die optische Pinzette verwendet werden. Ein z-kompensierter Lasermikrostrahl erlaubt präzise Materialbearbeitung während der Bildaufnahme, zum Beispiel um die Licht-Materie-Wechselwirkung im Detail zu untersuchen.

Die Abb. 2 zeigt einen mikroskopischen Strahlengang mit einer Probe P, einem Objektiv O und einer Tubulinse TL.

Über einen Umlenkspiegel US wird über eine Scanlinse SL und einen x/y Scanner SC sowie einen Umlenkspiegel US1 und einen dichroitischen Strahlteiler ST1 ein Laserstrahl L1 eingekoppelt, der die Probe P in x/y Richtung abscannt.

Der Strahlfokus in der Probe wird hierbei durch Verschieben des Objektives O in Z-Richtung über eine Ansteuereinheit AS höhenverstellt, so daß die Probe an unterschiedlichen Z-Positionen abgescannt werden kann.

Die von der Probe kommende Strahlung gelangt auf umgekehrten Weg über den Strahlteiler ST1 auf eine Detektoreinheit, bestehend aus Pinholeoptik PO, Pinhole PH sowie Detektor DE.

Weiterhin ist über einen weiteren Strahlteiler ST2 und eine Linse L eine HBO-Beleuchtung einkoppelbar.

Über den Strahlteiler ST2 und einen weiteren Strahlteiler ST3 werden weiterhin in einer Variante V1 über entsprechende Korrekturoptiken O1, O2 ein gepulster Laserstrahl L2 zum optischen Schneiden und ein weiterer Laserstrahl L3 als optische Pinzette (Optical Tweezer) eingekoppelt.

Beispielsweise kann es sich zur Lichteinkopplung um eine indirekte Einkopplung über Lichtleiter handeln, denen Kollimationsoptiken nachgeordnet sind.

Durch Verschieben der Optiken oder der Lichtleiterenden entlang der optischen Achse ändert sich die Strahlfokusposition des jeweiligen Lasers in der Probe P. Die Korrekturoptiken O1, O2 sind hierbei in der Variante V1 entlang der optischen Achse über die Ansteuereinheit AS verschiebbar angeordnet, wobei die Ansteuereinheit AS diese Verschiebewegung mit der Verschiebewegung des Objektives abstimmen kann.

Dies erfolgt durch eine zur Verschiebung des Objektives über errechnete oder vorher abgespeicherte Korrekturwerte abgestimmte gegenläufige Bewegung mindestens des Laserstrahles L3.

Zum einen wird erreicht, daß die Lage des Fokus innerhalb Probe in Z-Richtung definiert verändert werden kann.

Zum anderen kann ein mit der optischen Pinzette festgehaltenes Objekt vorteilhaft bei Verschiebungen des Objektives in Z-Richtung immer an derselben Stelle in der Probe verbleiben.

Neben der Bewegung der Optik O2 für den Laser L3 kann auch die Optik O1 für den Schneidelaser L2 entsprechend

bewegt werden und dadurch die Lage des Schnittes beliebig und auch von der Lage des Lasers L3 entkoppelt gewählt werden.

In der anschließend dargestellten Variante V2 ist für die Laser L2, L3 eine gemeinsame verschiebbliche Korrekturoptik O3 vorgesehen.

Auch hier kann durch zusätzlich in den Strahlengang des Lasers L2 einsetzbare unterschiedliche Optiken eine Entkopplung der Bewegung von L2 und L3 erreicht werden.

Weiterhin ist hier die Verwendung eines sogenannten Multibeam-Tweezers, d. h. einer Pinzette, bei der ein oder mehrere Laserstrahlen zum Festhalten von mehreren Objekten verwendet werden können, möglich.

Dies kann dadurch geschehen, daß der Laserstrahl L3 mit Hilfe eines Scannerspiegels in hoher Frequenz auf mehrere Objekte so gelenkt wird, daß diese gleichzeitig festgehalten werden können (C. Hoyer, S. Monajembashi, K. O. Greulich: Laser Manipulation and UV induced single molecule reactions of individual DNA molecules; Journal of Biotechnology 52 (1996), 65-73).

Anwendungsbeispiele

Organellen können häufig nicht scharf abgebildet werden, da sie sich während der Bildaufnahme bewegen. Nur durch den Einsatz einer kompensierten optischen Pinzette, die die Fixierung der Organellen während der Bildaufnahme ermöglicht, sind scharfe, dreidimensionale Abbildungen möglich. So können Zellorganellen wie zum Beispiel Chloroplasten oder Mitochondrien in lebenden Zellen fixiert und scharf dreidimensional abgebildet werden. Organellen, die sich normalerweise nicht bewegen, wie sekretorische Vesikel oder der Graviperzeptionsapparat, können mit der optischen Pinzette aus der Ursprungsposition ausgelenkt werden und die Reaktion der Zelle darauf (Reorganisation) dreidimensional untersucht werden. Durch Auslenkung aus der Ruhelage kann auch die Cytoskelettdynamik in lebenden Zellen untersucht werden.

Sphäroiden können als in-vivo Modell für Gewebe mit einer z-kompensierten optischen Pinzette im Laser Scanning Mikroskop dreidimensional manipuliert und untersucht werden.

Mit Hilfe von Vitalfarbstoffen können lebende Zellen so angefärbt werden, daß sie mit Fluoreszenzmikroskopie abgebildet werden können. Mit einer in ein konfokales Laser Scanning Mikroskop integrierten z-kompensierten optischen Pinzette sind so Untersuchungen zur Chromosomenorganisation in lebenden Zellen möglich. Ebenfalls sind mit dieser Anordnung dreidimensionale Abbildungen und Untersuchungen zum Teilungsprozeß an nichtadherenten Zellen möglich.

Patentansprüche

1. Anordnung zur Einkopplung mindestens eines Strahles einer optischen Pinzette zum Einfangen von Teilchen und/oder eines Bearbeitungsstrahles in einen mikroskopischen Strahlengang, vorzugsweise in einem Laser-Scanning-Mikroskop, wobei Mittel zur frei einstellbaren Veränderung der Lage des Strahlfokus der optischen Pinzette und/oder des Bearbeitungsstrahles bezüglich der Veränderung der Fokusposition des Mikroskopes vorgesehen sind, sind.
2. Anordnung nach Anspruch 1, wobei zur Veränderung der Lage des Strahlfokus eine separate bewegliche Optik vorgesehen ist.
3. Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei Strahlaustritt und/oder Beleuchtungsoptik

der Optischen Pinzette und/oder des Bearbeitungsstrahles in Richtung der optischen Achse verschiebbar sind.

4. Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Veränderung ansteuerbar ist und eine Bewegung der optischen Pinzette und/oder des Bearbeitungsstrahles in Gegenrichtung zur Bewegung des Mikroskopobjektives bewirkt. 5

5. Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche, mit einer definierten Ansteuerung der Verschiebung über vorgespeicherte oder errechnete Werte in Abhängigkeit von der Fokusposition. 10

6. Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei mehrere optische Pinzetten und/oder Bearbeitungsstrahlen vorgesehen, die einzeln und/oder gemeinsam bezüglich ihrer Fokusslage einstellbar sind. 15

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

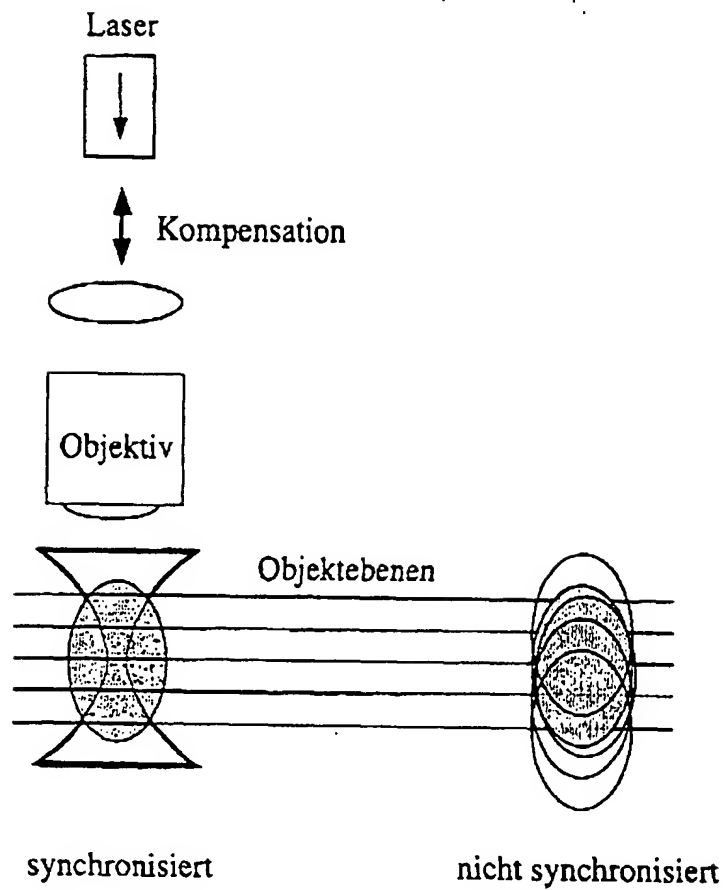


Abb. 1

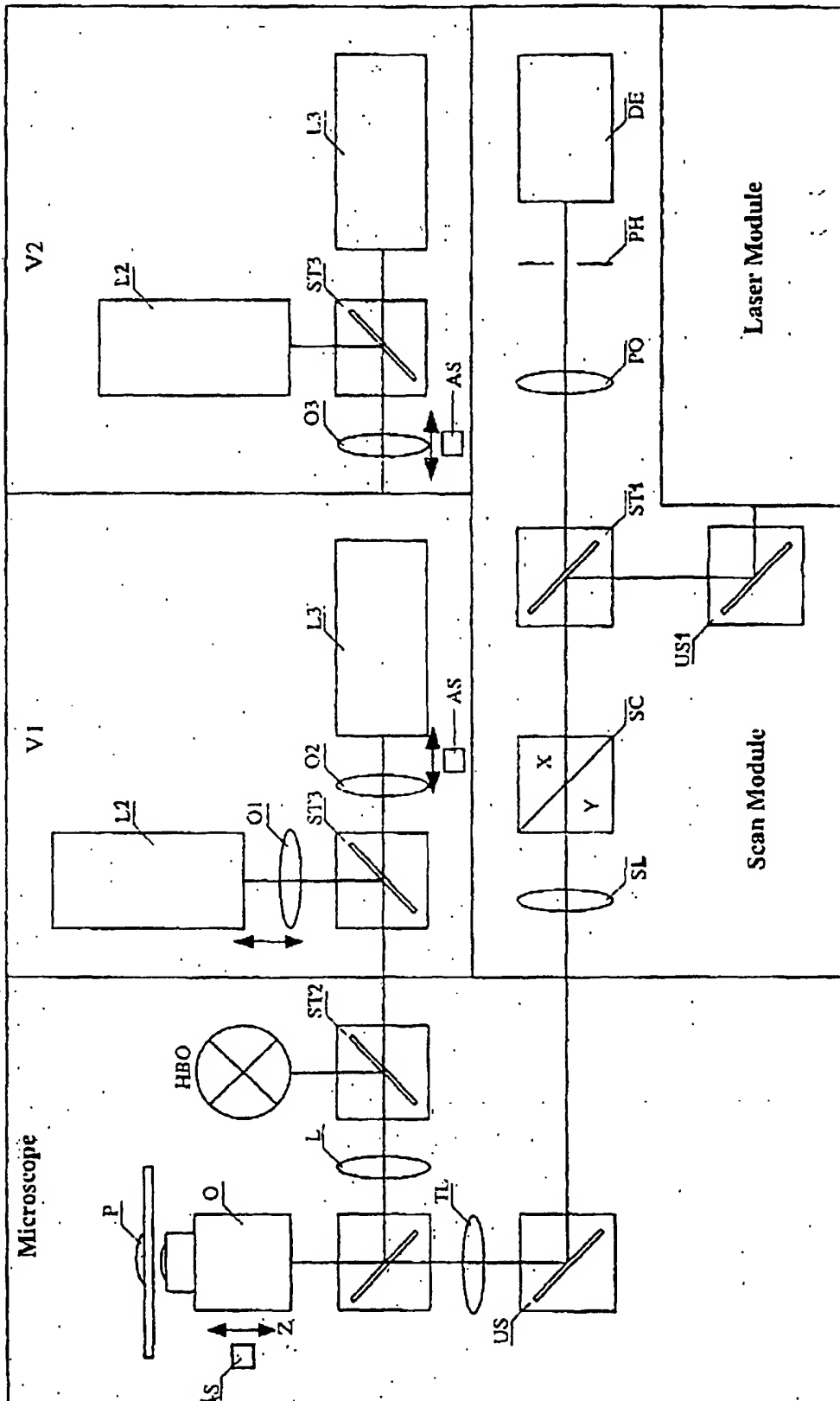


Abb. 2